

我国马铃薯抗病毒基因工程研究进展

张 鹤 龄

(内蒙古大学生命科学学院生物系 呼和浩特 010021)

摘 要: 10 年来我国已合成克隆了 PVX、PVY、PLRV 的外壳蛋白基因, 复制酶基因, 蛋白酶基因, 基因调控序列, 核酶 cDNA 及其他各种基因并进行了序列分析。建立了完善的致瘤农杆菌介导的马铃薯转化技术。通过外壳蛋白基因介导, 复制酶基因介导, 表达基因调控序列和核酶等基因工程途径, 获得了一批不同程度上抗 PVX、PVY、PVX 和 PVY, PVY 和 PLRV, PLRV 及高抗 PSTVd 的转基因马铃薯栽培种。这些转基因马铃薯多数已进入田间试验。不久一批抗病毒的优质高产的马铃薯栽培种, 经过进一步发育, 必将在生产中推广应用。抗病毒转基因马铃薯培育成功, 为我国马铃薯病毒病害防治开辟了一条崭新的途径, 也必将有力地促进我国马铃薯生产的发展。

关键词: 马铃薯病毒基因克隆; 抗病毒基因工程; 转基因马铃薯

中图分类号: S532, Q78

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 01-0025-06

1 前 言

马铃薯是同源四倍体作物。用常规育种方法改良品种, 其过程复杂且需时较长。尽管由于育种学家的长期努力已培育出许多食用加工的优良品种, 但至今许多优良栽培品种仍受到晚疫病、病毒病、环腐病、黑胫病的严重危害。如果能在保持现有优良品种的农艺性状的同时, 利用基因工程技术使其获得抗某种重要病害的性状, 对进一步发挥这些优良栽培种的潜力, 发展我国马铃薯生产均具有重要意义。Powell Abel (1986) 将 TMV 外壳蛋白基因转入烟草, 获得了延迟发病的抗病毒基因烟草。病毒外壳蛋白介导的抗性已迅速扩大到 15 个植物病毒属, 抗病毒转基因马铃薯已进入田间试验。这些抗病毒转基因马铃薯在生产上大面积推广应用, 在国内外即将成为现实。

2 马铃薯病毒基因的克隆和序列分析

自 1986 年以来, 病毒外壳蛋白介导的抗病性已成为植物抗病毒基因工程的一条成功的途径。为培育抗病毒转基因马铃薯, 中国科学院微生物所、北京大学、内蒙古大学的有关实验室自 1991 年

以来相继进行了马铃薯病毒的外壳蛋白基因、复制酶基因、其他基因及基因间隔区的 dDNA 克隆和序列分析。先后完成了马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析^[1], 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析^[2,3], 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因克隆和序列分析^[4,5], 马铃薯 Y 病毒复制酶 (N1b) 基因克隆和序列分析^[6,7], 马铃薯 Y 病毒 6KD 和 NIa 基因克隆与序列分析^[8], 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 (ORF_{2b}) 的克隆和序列分析^[9,10], 马铃薯卷叶病毒 56KD 的蛋白基因 (ORF₅) 及其 3'端非编码区的克隆和序列分析^[11], 马铃薯卷叶病毒基因组基因间隔区的克隆和序列分析^[12]及马铃薯卷叶病毒 ORF₁ (28KD 蛋白) 基因克隆和序列分析^[13]。现将 1991~1998 年我国已克隆的用于抗病毒基因工程马铃薯病毒基因及其作者列入下表。

3 外壳蛋白基因介导的抗病性

3.1 抗 PVX 或 PVY 的转基因烟草

王春香等 (1991) 将克隆的 PVX 外壳蛋白基因构建到双元载体 35S 启动子下游, 获得重组质粒 pEC7, 经三亲融合转入致瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。转化栽培烟草品种 G28 叶园片,

表 1 我国马铃薯病毒基因克隆和序列分析 (1991~1998)

病 毒	克隆基因	cDNA 长度 (bp)	年代	作者及文献
PVX	外壳蛋白	714	1991	王春香等, 植物学报, 1991, 33 (5) 363~369
PVY	外壳蛋白	807	1992	储瑞银等, 植物学报, 1992, 34 (3): 191~196
PVY	基因组 3'端区域	1317	1991	周雪荣等, 中国科学 (B 辑), 1991, (11): 1173~1179
PVY	NIb (复制酶)	1610	1994	彭学贤等, 生物多样性, 1994, 2 (1): 35~37
PVY	NIb (复制酶)	1551	1995	刘德虎等, 病毒学报, 1995
PVY	6KD-NIa	1509	1995	项瑜等, 病毒学报, 1995, 11 (2): 158~162
PLRV	外壳蛋白	627	1992	哈斯阿古拉等, Agricultural Bictechnology· Proceedings of Asia-Pacific Conference. 153~156
PLRV	外壳蛋白及其 5'先导序列	824	1996	赵福宽等, 内蒙古大学学报 (自然科学版), 1996, 27 (5): 689~694
PLRV	ORF2b (复制酶) 3'端	600	1997	梁成罡等, 病毒学报, 1997, 1 (3): 278~282
PLRV	ORF2b (复制酶) 5'端	1200	1998	梁成罡等, 病毒学报, 1998, 14 (4): 377~382
PLRV	56KD 蛋白基因及基因组 3'端非编码区	1671	1997	张荣信等, 病毒学报, 1997, 13 (3): 247~254
PLRV	IS (基因间隔区)	197	1996	董江丽等, 中国病毒学, 1996, 11 (2): 144~148
PLRV	ORF ₁ (28KD 蛋白)	830	1997	李英等, 1998, (发表中)

获得转基因烟草植株。经胭脂碱检测, ELISA 检测和 Western blot 分析表明在 20 株转基因烟草中有 12 株的外壳蛋白表达量达到可检出的水平。转基因烟草后代遗传分析表明, 自交一代中胭脂碱成分分离比例近似 3:1。用 15 μ g/ml 的 PVX 病毒液接种烟草, 两周后观察结果, 含有胭脂碱的转基因烟草后代大部分不发病, 而对照未转基因植株大都发病^[14]。项瑜等 (1995) 将马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因通过致瘤农杆菌 LBA4404 介导, 转入烟草生产品种 NC89 叶园片, 获得 6 个转基因烟草株系。Northern blot 分析表明 3 个转 CP 基因株系均产生了预期大小 1.5Kb 特异转录产物。Western blot 分析表明, 表达 PVY CP 基因的 3 个株系均能产生约 30KD 蛋白, 与 PVY 外壳蛋白大小一致。但 CP6 的 CP 表达量远低于 CP3 和 CP4。抗病性分析表明, 当用 50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml 的 PVY 分别接种基因烟草时, 则 CP3、CP4 二个株系在 50 μ g/ml 病毒浓度接种后所有植株均发病, 而 CP6 的所有植在 200 μ g/ml PVY 浓度拉种条件下无一发病。作者认为, 抗性程度和 PVY 外壳蛋白表达水平不成正相关^[15]。

3.2 抗 PVY 的转基因马铃薯

宋艳茹等 (1996) 将 PVY 外壳蛋白基因通过

致瘤农杆菌介导转化马铃薯栽培种 Favorita、虎头和克新 4 号。用 PCR 和 Southern 杂交检测表明转基因马铃薯植株染色体上整合有 PVY CP 基因并转录出 2.1 Kb RNA。接种病毒后用 ELISA 测定转基因马铃薯植株中 PVY 增殖情况, 结果表明均较未转基因的对照有所降低, 同时转基因马铃薯生长发育正常, 部分植株单株产量高于未转基因的马铃薯^[16]。

3.3 抗 PLRV 转基因马铃薯

张鹤龄等 (1995) 将本室克隆的马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因, 构建到植物表达载体——二元载体 pROK2 中, 通过致瘤农杆菌介导, 转入马铃薯栽培和 Desiree、Foavorita、虎头、乌盟 601 和台湾红皮 5 个品种中。转入的 CP 基因在转录水平上获得表达。但转基因植株中未能测出 PLRV 的外壳蛋白。每个四倍体基因组中有 1~5 个外壳蛋白基因拷贝。用桃蚜接种 PLRV, 用 DAS-ELISA 方法检测转基因马铃薯植株中的 PLRV 浓度, 结果转基因 Desiree 乌盟 601 和 Favorita 中的 PLRV 浓度较未转基因对照分别降低 86.17%、67.5% 和 69.4%。从而证明转基因马铃薯中外壳蛋白基因的表达干扰了接种病毒的增殖。转基因植株无 PLRV 初期感染症状或症状轻微, 但不同转基因株系之间

抗性有差异。同一个转基因株系中也出不同抗性单株。产量分析表明, Desiree 和乌盟 601 转 CP 基因株系的平均单株产量较未转基因对照高 1.5~2 倍, 但 Favorita 的 6 个转基因株系中只有 2 个株系单产高于对照, 4 个低于对照。用蚜虫从转基因 Desiree 植株传播 PLRV 到洋酸浆的试验表明, 其传播效率较未转基因植株降低 64.2%~91.1%。表明转基因马铃薯可减少蚜虫在田间传播 PLRV^[17]。

3.4 抗病性与基因沉默

为了探讨转基因马铃薯抗病毒机理, 乔建军等 (1998) 用 Northern blot 方法分析了表达 PLRV CP 基因的乌盟 601 高抗病毒植株和感染 PLRV 的植株, 结果在结薯抗性转基因植株中 PLRV CP 基因转录产物量明显低于感病植株。而体内病毒含量和病毒 RNA 含量均保持在低水平, 表现为一种基因沉默。一般认为抗性植株体内表达的外壳蛋白基因达到一定量之后引起植物细胞质中某种机制被激活, 导致转化基因——CP RNA 被降解, 同时也降解了与转化基因具有同源序列的侵入的病毒外壳蛋白基因转录的 RNA, 从而建立了抗性^[18]。

3.5 表达双价外壳蛋白基因的马铃薯抗病性

为培育能抗两种病毒或三种病毒的转基因马铃薯, 崔晓江等 (1994) 构建了含有 PVX 和 PVY 两种病毒外壳蛋白基因的植物表达载体 pCSYX303, 含有 PVY 和 PLRV 两种病毒外壳蛋白基因的表达载体 pESYL303 及含有 PVY、PVX 和 PLRV 三种外壳蛋白基因的表达载体 pCSYXL303。使其中 CP 基因转录方向一致, 顺向重复排列, 且各有其自己的 35S 启动子、真核翻译增强序列 Ω 和 Nos 终止子^[19]。宋艳茹等 (1994) 用 PVX 和 PVY 双价 CP 基因转化了马铃薯虎头和克新 4 号, 用 PVY 和 PLRV 双价 CP 基因转化了马铃薯虎头和 Favorita^[20]。张鹤龄等 (1996、1997) 鉴定了表达 PVX、PVY 双价 CP 基因和 PVY、PLRV 双价 CP 基因转基因马铃薯的抗病性。结果表明, 用 PVX (10 μ g/ml) 和 PVY (60 μ g/ml) 接种后双价 CP 基因转化的马铃薯虎头和克新 4 号的多数株系的平均病毒含量均明显低于未转基因对照植株, 表现病毒积累缓慢, 发病延迟。表明转基因马铃薯对 PVX 和 PVY 复合感染产生不同程度的抗性和保护作用。在转基因株系中出现感病植株, 但也出现高抗 PVX 或 PVY 一种病毒的植株和同时高抗 PVX 和

PVY 两种病毒的植株^[20]。表达 PVY 和 PLRV 双价 CP 基因的 Favorita 和虎头, 经磨擦接种 PVY 和用桃蚜接种 PLRV 后, 转基因株系中 PVY 和 PLRV 的平均浓度均较未转基因对照植株低, 且无症状或症状轻微。虽然均表达相同的双价 CP 基因, 但相对而言, Favorita 对 PVY 抗性较为明显, 在 9 个转基因株系中有 6 个株系 PVY 浓度较未转基因植株降低 52.5%~90%, 而虎头对 PLRV 抗性较为明显, 在 7 个转基因株系中有 4 个株系 PLRV 含量较对照降低 53.0%~98.0%。在抗性株系中也出现一些对一种病毒 PVY 或 PLRV, 或同时对两种病毒抗性较强的单株^[22]。

4 复制酶基因介导的抗病性

项瑜等 (1996) 构建了 PVY-CNIB 基因的全长序列, 5'端缺失 381 个碱基和 NIB 反意 RNA 三种不同形式植物表达载体, 通过致瘤农杆菌 LBA4404 介导转化烟草栽培种 NC89, 获得了上述三种转基因烟草植株^[21]。抗病性试验表明以 5'端缺失的 NIB 基因转化的植株抗病性最好。从 20 个转基因株系中选出 4 个株系, 此 4 个株系在用 100 μ g/ml PVY 接种条件下表现完全抗病。而在全长 NIB 基因转化株系中, 仅选出 1 个株系, 在 100 μ g/ml PVY 攻毒下表现完全抗病性。在 33 个 NIB 基因反义 RNA 的转化植株中无任何株系表现完全抗病, 只有部分株系延迟发病或症状减轻。转基因植物中 RNA 分析表明, 可检出 PVY NIB 基因特异转录物—mRNA, 大小为 1.6~2.0Kb。但未能检测到其相应蛋白表达产物。作者认为非完整的或非正常的复制酶基因表达产物干扰了正常病毒复制过程, 从而产生了抗病性。

鲁瑞芳等 (1998) 利用 PCR 定点突变方法使 PVY NIB 基因 5'端 ATG 起读码子缺失, 同时也使近 5'端第 22 位处于同一阅读框架中的 ATC 突变成 TTT, 构建成不可转译的 NIB 基因 (UN)。转化烟草 NC89, 获得转基因植株。抗病性分析表明, T₀ 代转基因烟草对 PVY 和烟草蚀纹病毒 (TEY) 抗病性与表达全长 NIB 基因和缺失 5'端的 NIB 基因的 T₂ 代转基因烟草相同。作者认为 PVT NIB 基因在转录水平上介导产生广谱抗病性^[24]。

已将马铃薯卷叶病毒复制酶基因 (ORF2b) 的 3'端 0.6 Kb 和 5'端 1.2 Kb 转入马铃薯, 抗病性试

验正在进行中^[25]。鉴于有报道证明, 用烟草脉斑驳病毒 (TVMV) 和 PVY 的 NIa 基因或 NIa 基因及其前后若干基因共同转化烟草获得了较好抗病毒效果^[26,27], 项瑜等 (1995) 已将 PVY 病毒 6KD 和 NIa 基因克隆并构建于植物表达载体中^[8]。

5 用病毒基因调控序列转化马铃薯

马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 是正链 RNA 病毒, 基因组全长 6.0Kb。整个基因组可分为 5' 端编码区和 3' 端编码区, 中间一段为长 197bp 的非编码区, 称为基因间隔区 IS。在 3' 端编码区有三个基因, 23KD 外壳蛋白基因 (ORF3)、17KD 蛋白基因 (ORF4) 和 56KD 蛋白基因 (ORF5)。已证明 PLRV 3' 端这三个基因是通过亚基因组方式表达的^[24]。在 PLRV 基因间隔区内有一段类似于雀麦花叶病毒 (BMV) 亚基因组启动了序列的富含 U 区域 (UUAUU)。推测此区域可能是 PLRV 亚基因 RNA 的启动子。设想如能在转基因马铃薯内表达出 IS 区域反义 RNA 必将与 PLRV 亚基因 RNA 的启动序列相结合, 封闭启动子, 干扰病毒亚基因组转录, 从而干扰 PLRV 外壳蛋白基因等的正常表达, 达到干扰病毒复制的目的。此外, IS 反义 RNA 可以和已合成的亚基因组 RNA 结合阻碍其正常转译表达。因此非编码 IS 序列反义 RNA 在转录和转译两个水平上均有可能干扰病毒复制从而有可能建立一种抗病毒基因工程新途径。董江丽等 (1996) 合成克隆了 PLRV-Ch IS 序列 cDNA^[12] 以正向和反向两种方式分别构建到植物转化载体 pROK2 中, 转化了马铃薯 Desiree, 获得转基因植株。将转基因 Desiree 植株移栽网室用桃蚜接种 PLRV。试验表明, 表达 IS 区正义和反义 RNA 的转基因植株, 接种病毒后无症状, 或症状轻微。用 ELISA 测定转基因植株中 PLRV 浓度, 均较未转基因对照植株低。表达正义 RNA 的转基因植株 PLRV 浓度降低 43%~72%, 表达反义 RNA 的转基因植株降低 72%~86%。表达 IS 区的反义 RNA 的转基因植株对 PLRV 抗性较强^[29]。

6 用核酶切割 PLRV-RNA

核酶 (Ribozyme) 是一种能特导切割 RNA 分子的, 具有锤头、发夹或斧头结构的小分子 RNA。近年来, 广泛开展了应用核酶切割人和动物病毒、

植物病毒和类病毒核酸的研究。核酶已成为控制病毒的有力手段。Lamb 等 (1990) 设计合成了两种特异切割 PLRV RNA 的核酶并实现了体外切割^[30]。郭旭东等 (1997) 针对 PLRV 外壳蛋白基因第 356~358 位 “GUC” 设计合成了一种锤头状核酶 cDNA, 克隆于 pSPT19 的 Sp6 启动子下游, 利用 SP6 RNA 聚合酶进行体外转录, 获得核酶 RNA 分子。用同法获得靶 RNA 序列并成功地实现了体外切割^[31]。杨静华等 (1998) 设计合成了特异切割 PLRV 复制酶基因负链 1650~1652 位 GUC 的锤头状核酶 cDNA, 克隆于 pSPT19 的 T7 启动子下游。经体外转录获得核酶 RNA 分子, 用同法获得靶 RNA 序列, 并成功地完成了体外特异切割^[32]。

除上述特异切割 PLRV 外壳蛋白基因和复制酶基因负链核酶外, 已设计合成了切割 PLRV 复制酶基因负链双切点双体核酶和突变核酶 cDNA, 分别构建于植物表达载体中, 用于马铃薯转化, 进一步研究转基因马铃薯植株内核酶的抗病效果。

7 抗 PSTVd 基因工程

曾经试图用分子交互保护作用 (Molecular cross-protection) 防治 PSTVd。将 PSTVd cDNA 单体构建到植物表达载体 pCGN 162a 和 pCGN 162b 中, 通过致瘤农杆菌介导转化易感马铃薯栽培种 Mariva 和 Tichuasi, 获得转基因工程植株。使转入马铃薯植株体内的 PSTVd cDNA 不能转录出侵染性 RNA, 但能起到交互保护作用^[33]。结果没有达到预期目的。近年来我国将人工设计合成的特异切割 PSTVd RNA 的核酶 (Ribozyme) 基因转入马铃薯, 取得了抗 PSTVd 基因工程的新进展。

叶寅等 (1992) 选择 PSTVd 正链 RNA 第 246 位 GUC (位于中央保守区, C 区内) 设计合成锤头状核酶 cDNA。同时又针对 PSTVd 负链 RNA 的第 320 位 GUC (位于 T 区) 设计合成特异切割 PSTVd 负链 RNA 的锤头状核酶 cDNA。切割正链 RNA 的核酶 cDNA 长 50 个核苷酸, 识别区的 5' 端互补序列有 9 个核苷酸, 3' 端有 11 个核苷酸。切割负链 RNA 的核酶 dDNA 长 49 个核苷酸, 5' 端互补序列长为 10 个核苷酸, 3' 端为 11 个核苷酸。分别克隆于体外转录载体, pGEM-3Zf (+) 的 SP6 启动子下游。体外转录获得核酶 RNA。在体外将

PSTVd 双体 RNA 切割成预期大小的片段^[34]。

杨希才等 (1996) 将特切割 PSTVd 负链和正链 RNA 的核酶双体基因构建于植物表达载体 pROK2 中 35S 启动子下游, 通过致瘤农杆菌介导转化马铃薯 Desiree 块茎叶园片, 获表达核酶的转基因马铃薯。抗病性试验表明, 用切割 PSTVd 负链 RNA 的双体核酶转化的 34 株转基因马铃薯, 接种 PSTVd 后一月, 有 23 株检测不到完整的 PSTVd RNA。11 株中 PSTVd RNA 明显低于对照未转基因植株。表达核酶的马铃薯生长正常。用 PCR 扩增法和 Northern blot 杂交能检出转基因植株中核酶表达产物。表达切割 PSTVd 正链的核酶双体基因的 6 个转基因马铃薯植株中有 2 株未检出 PSTVd。未转基因的 Desiree 植株, 接种 PSTVd 后, 均含有较高浓度的 PSTVd。为验证核酶在转基因马铃薯中的抑制 PSTVd 复制的效果, 用点突变和 PCR 方法将核酶保守序列中“CUGA”改为“CUUA”, 构建成核酶突变体基因, 依同法转化马铃薯, 接种 PSTVd 后分析其抗病性。结果表明在转基因马铃薯中有核酶突变体的表达产物, 但不能抑制其中 PSTVd 复制。进一步证实了在体内核酶抑制 PSTVd 复制的作用。这是国内外首次利用核酶控制马铃薯纺锤块茎类病毒获得成功的例子^[35, 36]。

为增强核酶在体内特异切割功能和防止由于病原突变而导致单一切点核酶作用的降低, 邓文生等 (1998) 构建了切割 PSTVd 负链 RNA 211 位 GUC 和 235 位 GUC 的双切点双体核酶 cDNA, 全长 89nt, 211~235GUC 位点之间相距 21 个 nt, 两侧互补臂长为 5' 端 (235~244) 9 个 nt, 3' 端 (199~211) 11nt。三切点三体核酶是将双切点双体核酶与切割负链上第 324 位 GUC 的单价核酶双体相连而成。将上述两种多切点核酶 cDNA 构建于 pGEM-7Zf (+) 载体中进行体外转录和体外切割试验。结果表明双切点核酶切割产物大小与预期相符。而三切点三价核酶只表现有单一切点活性^[37]。

为确定抗 PSTVd 转基因马铃薯植株中核酶在细胞内的表达部位, 刘灿辉等 (1998) 将抗 PSTVd 的转基因马铃薯根尖组织进行切片, 用³⁵S 标记的核酶 cDNA 探针进行原位杂交, 通过检测³⁵S 标记的杂交体确定核酶转录产物在细胞中的分布。结果表明核酶转录产物主要分布在转基因马

铃薯细胞的细胞核中, 从而支持了核酶对核内复制或核内复制阶段的类病毒和病毒更为有效的论点^[38]。

8 结束语

90 年代我国马铃薯抗病毒基因工程已取得长足进展。我国已合成克隆出用于转化马铃薯的病毒外壳蛋白基因、复制酶基因、蛋白酶基因、基因调控区序列、核酶 cDNA 以及其他各种基因约 20 余种; 建立完善了致瘤农杆菌介导的马铃薯转化技术; 通过外壳蛋白介导、复制酶基因介导、表达基因调控区、表达该酶等多种途径, 获得一批抗 PVX, 抗 PVY, 抗 PVX 和 PVY, 抗 PVY 和 PLRV, 抗 PLRV, 抗 PSTV 的转基因马铃薯栽培种。这些转基因马铃薯多数已进入田间试验。其中转 PVY 外壳蛋白基因的马铃薯在云南省种植面积已有 6 hm² 之多。

我国抗病毒转基因马铃薯的培育成功, 以发展我国马铃薯生产具有重要意义。不久, 一批抗病毒的优良马铃薯栽培品种, 经过几年田间试验和进一步选育以后, 必将在生产中推广种植, 为我国马铃薯病毒病有效防治开辟了一条崭新的途径。另一方面, 抗病毒转基因马铃薯的研究也必将为马铃薯抗病抗虫基因工程打下基础, 为进一步广泛开展抗细菌、真菌、线虫基因工程创造了条件。

我国的抗病毒转基因马铃薯研究工作虽较国外起步较迟, 但在整体上与国外处于相同的水平。有的研究工作处于国际领先水平, 如高抗 PSTVd 的表达核酶的转基因马铃薯的培育。这项研究成果不仅通过表达核酶途径获得高抗 PSTVd 的马铃薯, 同时还提出了对于那些在细胞核内转录的或具有核内转录阶段的病毒和类病毒, 通过体内表达核酶, 特异切割其核酶, 抑制其增殖能获得明显的抗病效果。此外我们有的研究工作也具有特色, 如采用结构基因、非结构基因和抗病毒蛋白、DI 分子以外的新的抗病毒基因工程途径, 通过基因间隔区 (IS) 干扰病毒亚基因组表达等, 从思路、作法和获得的结果来看都是可取的。

首先马铃薯以无性繁殖为主, 转化基因可长期稳定表达; 其次, 以致瘤农杆菌介导的转化马铃薯的技术成熟, 转化后的块茎和叶园片易于再生小植株; 再次, 马铃薯地上地下均可获得较大的生物

量。由于这些原因使马铃薯已成为转基因模式植物, 被认为是一个良好的生物反应器。可用转基因技术, 在马铃薯中合成人血清蛋白、免疫球蛋白、动物疫苗、环状糊精和可降解塑料等。抗病毒转基因马铃薯研究也必将促进马铃薯作为生物反应器研究的进展。

回顾十年来我国在抗病毒基因工程研究领域取得的可喜进展和摆在面前的具体研究成果无疑后进一步鼓舞和增强我们面向 21 世纪的科研和开发工作的信心。我们确信我国的马铃薯基因工程研究在 21 世纪一定会取得更大的进展。

参 考 文 献

- [1] 王春香, 高谦, 潘乃璁等. 马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆和全序列测定. 植物学报, 1991, 33: 363~369
- [2] 周雪荣, 方荣祥, 王成球等. 马铃薯 Y 病毒基因组 3' 端区域的克隆和序列分析. 中国科学 B 辑 (11): 1173~1179
- [3] 储瑞银, 郭涛, 潘乃璁等. 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析. 植物学报, 1992, 34 (3): 191~196
- [4] 哈斯阿古拉等. The cDNA synthesis, molecular cloning and nucleotide sequence of potato leafroll virus coat protein gene. Proceedings of Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, 1992, Beijing China, P. 153~156
- [5] 赵福宽, 张鹤龄, 梁成罡等. 马铃薯卷叶病毒中国分离株外壳蛋白基因及其上游先导序列的 cDNA 克隆和序列分析. 内蒙古大学 (自然科学版), 1996, 27 (6): 689~694
- [6] 彭学贤、项瑜, 刘俊君等. 马铃薯 Y 病毒复制酶基因的克隆和序列分析. 生物多样性, 1994, 2 (1): 35~37
- [7] 刘德虎等. 马铃薯 Y 病毒复制酶基因 (NIB) 克隆和序列分析及植物表达载体构建, 1995
- [8] 项瑜, 杨兰英, 彭学贤等. 马铃薯 Y 病毒 6KD 和 NIa 基因的克隆与序列分析其植物表达载体的构建. 病毒学报, 1995, 11 (3): 279~282
- [9] 梁成罡, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 3' 端克隆及序列分析. 病毒学报, 1997, 13 (3): 278~282
- [10] 梁成罡, 张彤, 哈斯阿古拉等. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 5' 端克隆及序列分析. 病毒学报, 1998, 14 (4): 377~382
- [11] 张荣信, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒 56KD 蛋白基因及 3' 端非编码区克隆和序列分析. 病毒学报, 1997, 13 (3): 248~254
- [12] 董江丽, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区的克隆及序列分析. 中国病毒学, 1996, 11 (2): 144~148
- [13] 李英, 张鹤龄等. 马铃薯卷叶病毒 ORF₁ 及其 5' 端上游非编码区克隆及序列分析. 1998 (发表中)
- [14] 王春香, 杨美珠, 潘乃璁等. 马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因在转基因烟草植株中的表达及抗病. 植物学报, 1993, 35 (11): 819~824
- [15] 项瑜, 杨兰英, 周雪荣等. 表达马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的转基因烟草的抗病性研究. 病毒学报, 1995, 11 (2): 158~162
- [16] 宋艳茹, 马庆虎, 侯林林等. 转 PVY 外壳蛋白基因马铃薯及其田间实验. 植物学报, 1996, 38 (9): 711~718
- [17] 张鹤龄, 李天然, 哈斯阿古拉等. 抗卷叶病毒 (PLRV) 转基因马铃薯栽培种及其抗病性研究. 病毒学报, 1995, 11 (4): 342~350
- [18] 乔建军, 张鹤龄等. 表达 PLRV CP 基因的马铃薯植株的抗病性与基因沉默. 1998 (发表中)
- [19] 崔晓江, 彭学贤, 沈禹飞等. 马铃薯单双三价抗病毒基因表达载体的构建. 生物工程学报, 1994, 10 (2): 185~189
- [20] 宋艳茹, 李枫, 侯林林等. 双价外壳蛋白基因植物表达载体的构建及马铃薯转基因植物的鉴定. 植物学报, 1994, 36 (11): 842~848
- [21] 张鹤龄, 宋艳茹, 彭学贤等. 表达马铃薯 X 病毒、Y 病毒双价外壳蛋白基因马铃薯转基因植株的抗病性. 病毒学报, 1996, 12 (4): 360~366
- [22] 张鹤龄, 彭学贤, 宋艳茹等. 表达 PVY 和 PLRV 双价外壳蛋白基因转基因植株的抗病性研究. 植物学报, 1997, 9 (3): 236~240
- [23] 项瑜, 杨兰英, 彭学贤等. 改造的马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导高度抗病性. 生物工程学报, 1996, 12 (3): 258~265
- [24] 鲁瑞芳, 吕鹏飞, 彭学贤. 马铃薯 Y 病毒 NIB 复制酶基因在转录水平介导的相对广谱抗病毒性. 1998
- [25] 刘知胜, 张鹤龄等. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 5' 端植物表达载体的构建及马铃薯转化. 1998 (发表中)
- [26] Maiti E et al. Plants that express a polyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 6110~6114
- [27] Vard E et al. Plants transformed with a cistron of a potato virus Y proteinase (Ia) are resistant to virus infection. Proc. Natl Acad Sci USA. 1993, 90: 7513~7515
- [28] 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 基因组研究进展. 中国病毒学, 1996, 11 (1): 1~8
- [29] 董江丽, 李天然, 哈斯阿古拉等. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区转化的马铃薯抗病性研究. 中国病毒学, 1994, 14 (1): 66~72
- [30] Lamb J W and Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase gene. J Gen Virol. 1990, 71: 2257~2264
- [31] 郭旭东, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 应用核酶体外切割马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的研究. 中国病毒学, 1999, 12 (2): 149~154
- [32] 杨静华, 哈斯阿古拉, 梁成罡等. 特异切割马铃薯卷叶病毒复制酶基因负链的核酶研究. 病毒学报, 1998, 14 (2): 158~164
- [33] Annual Report CIP. 1988, P. 84
- [34] 叶寅, 刘怡之, 赵丰等. 特异切割马铃薯纺锤块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性测定. 中国科学 B 辑, 1992, 5: 491~496
- [35] 杨希才, 朱锋, 刘玉乐等. 抗纺锤形块茎类病毒的转核酶基因马铃薯的研究. 科学通报, 1996
- [36] Yong X C. Yie Y, Zhu F, Liu Y L, Kang L Y, Wang X F, Tien P. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4861~4865
- [37] 邓文生, 杨希才, 康良仪等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒负链的多价核酶的构建和体外活性测定. 1998
- [38] 刘灿辉, 杨希才, 王小凤等. 高抗马铃薯纺锤形块茎类病毒的转基因马铃薯细胞内核酶转录产物的分布. 1998